



## Bescheinigung

Die Bayer Aktiengesellschaft in Leverkusen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Nukleinsäuren, die für Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten von Insekten kodieren"

am 4. Mai 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 4. März 1999

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 19 829.9

Hiebinger

5

**Nukleinsäuren, die für Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten von Insekten kodieren**

10

Die Erfindung betrifft insbesondere Nukleinsäuren, die für Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten von Insekten kodieren.

15

Nikotinische Acetylcholinrezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die eine Rolle bei der Neurotransmission im Tierreich spielen. Die Bindung von Acetylcholin oder anderen Agonisten an den Rezeptor verursacht eine vorübergehende Öffnung des Kanals und gestattet den Durchstrom von Kationen. Man nimmt an, daß ein Rezeptor aus fünf Untereinheiten besteht, die sich um eine Pore gruppieren. Jede dieser Untereinheiten ist ein Protein, das aus einem extrazellulären N-terminalen Teil besteht, gefolgt von drei Transmembranregionen, einem intrazellulären Teil, sowie einer vierten Transmembranregion und einem kurzen extrazellulären C-terminalen Teil (Changeux et al. 1992).

25

30

35

Acetylcholinrezeptoren sind vor allem in Wirbeltieren gut untersucht. Anhand ihrer anatomischen Lokalisierung und ihrer funktionellen Eigenschaften (Leitungseigenschaften des Kanals, Desensibilisierung, Sensitivität gegenüber Agonisten und Antagonisten, sowie gegenüber Toxinen wie z.B.  $\alpha$ -Bungarotoxin) lassen sich hier drei Gruppen unterscheiden. Die Einteilung korreliert mit der molekularen Zusammensetzung der Rezeptoren. Es gibt heterooligomere Rezeptoren mit der Untereinheitenzusammensetzung  $\alpha_2\beta\gamma\delta$ , die im Muskel vorkommen (Noda et al. 1982, Claudio et al. 1983, Devillers-Thiery et al. 1983, Noda et al. 1983a, b), heterooligomere Rezeptoren, die Untereinheiten aus der Gruppe  $\alpha_2 - \alpha_6$  und  $\beta_2 - \beta_4$  enthalten, und die im Nervensystem vorkommen (Wada et al. 1988, Schoepfer et al. 1990, Cockcroft et al. 1991, Heinemann et al. 1997), sowie homooligomere Rezeptoren, die Untereinheiten aus der Gruppe  $\alpha_7 - \alpha_9$  enthalten, und die ebenfalls im Nervensystem vorkommen (Lindstrom et al. 1997, Elgoyhen et al. 1997). Diese Einteilung wird auch durch eine Betrachtung der Verwandtschaft der Gensequenzen der

5

verschiedenen Untereinheiten gestützt. Typischerweise sind die Sequenzen funktionell homologer Untereinheiten verschiedener Spezies ähnlicher als Sequenzen von Untereinheiten aus verschiedenen Gruppen, aber der gleichen Spezies. So weist z.B. die muskuläre  $\alpha$ -Untereinheit der Ratte 78 % identische und 84 % ähnliche Aminosäuren auf mit der des elektrischen Rochens *Torpedo californica*, aber nur 48 % Identität und 59 % Ähnlichkeit mit der  $\alpha 2$ -Untereinheit (heterooligomer, neuronal) der Ratte, und 36 % Identität und 45 % Ähnlichkeit mit der  $\alpha 7$ -Untereinheit (homooligomer, neuronal) der Ratte. Weiterhin sind die Gensequenzen aller bekannten Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten nicht nur untereinander in gewissem Maße ähnlich, sondern auch mit denen einiger anderer ligandengesteuerter Ionenkanäle (z.B. den Serotoninrezeptoren vom Typ 5HT<sub>3</sub>, den GABA-gesteuerten Chloridkanälen, den Glycin-gesteuerten Chloridkanälen). Man geht daher davon aus, daß alle diese Rezeptoren von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen und ordnet sie in eine Supergenfamilie ein (Ortells et al. 1995).

15

20

25

30

In Insekten ist Acetylcholin der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter des zentralen Nervensystems. Dementsprechend lassen sich Acetylcholinrezeptoren an Präparaten zentraler Ganglien aus Insekten elektrophysiologisch nachweisen. Der Nachweis gelingt sowohl an post- als auch an präsynaptischen Nervenendigungen, sowie an den Zellkörpern von Interneuronen, Motoneuronen und modulatorischen Neuronen (Breer et al. 1987, Buckingham et al. 1997). Unter den Rezeptoren gibt es solche, die durch  $\alpha$ -Bungarotoxin inhibiert werden, und solche, die insensitive sind (Schloß et al. 1988). Die Acetylcholinrezeptoren sind außerdem der molekulare Angriffspunkt wichtiger natürlicher (z.B. Nikotin) und synthetischer Insektizide (z.B. Chloronikotinyle).

35

Die Gensequenz einer Anzahl von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren der Insekten ist bereits bekannt. So sind in *Drosophila melanogaster* die Sequenzen fünf verschiedener Untereinheiten beschrieben (Bossy et al. 1988, Hermanns-Borgmeyer et al. 1986, Sawruk et al. 1990a, 1990b, Schulz et al. unveröffentlicht, EMBL accession

5

number Y15593), in *Locusta migratoria* ebenfalls fünf (Stetzer et al. unveröffentlicht, EMBL accession numbers AJ000390 - AJ000393), in *Schistocerca gregaria* eine (Marshall et al. 1990), in *Mycus persicae* zwei (Sgard et al. unveröffentlicht, EMBL accession number X81887 und X81888), in *Manduca sexta* eine Sequenz (Eastham et al. 1997). Zudem ist eine Reihe von partiellen Gensequenzen aus *Drosophila melanogaster* als sog. expressed sequence tags charakterisiert worden (Genbank accession numbers AA540687, AA698155, AA697710, AA697326). Die hohe Ähnlichkeit einzelner Sequenzen mit solchen aus anderen Insekten legt nahe, daß es sich bei diesen Untereinheiten um funktionelle Homologe handelt.

15

Es ist von großer praktischer Bedeutung, beispielsweise für die Suche nach neuen Insektiziden, neue Untereinheiten von Acetylcholinrezeptoren aus Insekten bereitzustellen, wobei besonders solche von Interesse sind, die sich von den bekannten stärker unterscheiden, als dies zwischen funktionellen Homologen der Fall ist.

20

Der vorliegenden Erfindung liegt somit insbesondere die Aufgabe zugrunde, Nukleinsäuren zur Verfügung zu stellen, die neue Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten von Insekten kodieren.

25

Die Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung von Nukleinsäuren umfassend eine Sequenz ausgewählt aus

(a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5,

30

(b) zumindest 14 Basenpaare langen Teilsequenzen der unter (a) definierten Sequenzen,

35

5

- (c) Sequenzen, welche an die unter (a) definierten Sequenzen hybridisieren in 2 x SSC bei 60°C, bevorzugt in 0,5 x SSC bei 60°C, besonders bevorzugt in 0,2 x SSC bei 60°C (Sambrook et al. 1989),

10

- (d) Sequenzen, welche eine zumindest 70 %ige Identität zu den unter (a) definierten Sequenzen zwischen Position 1295 und Position 2195 aus SEQ ID NO: 1 oder zwischen Position 432 und Position 1318 aus SEQ ID NO: 3 oder zwischen Position 154 und Position 1123 aus SEQ ID NO: 5 aufweisen,

15

- (e) Sequenzen, welche zu den unter (a) definierten Sequenzen komplementär sind und

20

- (f) Sequenzen, welche aufgrund der Degeneration des genetischen Codes für dieselbe Aminosäuresequenz kodieren wie die unter (a) bis (d) definierten Sequenzen.

25

Der Grad der Identität der Nukleinsäuresequenzen wird vorzugsweise bestimmt mit Hilfe des Programms GAP aus dem Programmpaket GCG, Version 9.1 unter Standardeinstellungen.

30

Die vorliegende Erfindung begründet sich auf den überraschenden Befund, daß Insekten Gene besitzen, die für Untereinheiten von insbesondere homooligomeren Acetylcholinrezeptoren kodieren.

35

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Vektoren, die zumindest eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten. Als Vektoren können alle in molekularbiologischen Laboratorien verwendete Plasmide, Phasmide, Cosmide, YACs oder künstliche Chromosomen verwendet werden. Für die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können diese mit üblichen regulatorischen Sequenzen verknüpft

5

werden. Die Auswahl solcher regulatorischen Sequenzen ist davon abhängig, ob zur Expression pro- oder eukaryotische Zellen bzw. zellfreie Systeme verwendet werden. Besonders bevorzugt als Expressionskontrollsequenz sind z.B. der frühe oder späte Promotor des SV40 oder des Adenovirus, des Cytomegalovirus, das lac-System, das trp-System, die Haupt-Operator- und Promotorregionen des Phagen lambda, die Kontrollregionen des fd-Hüllproteins, der Promotor der 3-Phosphoglyceratkinase, der Promotor der Sauren Phosphatase und der Promotor des  $\alpha$ -Mating-Faktors der Hefe.

10

15

Zur Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können diese in geeignete Wirtszellen eingebracht werden. Als Wirtszellen eignen sich sowohl prokaryotische Zellen, vorzugsweise E.coli, als auch eukaryotische Zellen, vorzugsweise Säuger- oder Insektenzellen. Weitere Beispiele für geeignete einzellige Wirtszellen sind: Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces, Hefen, HEK-293, Schneider S2, CHO-, COS1-, COS7-, Zellen, Pflanzenzellen in Zellkultur sowie Amphibienzellen, insbesondere Oocyten.

20

25

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die Polypeptide, die von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodiert werden, sowie die daraus aufgebauten Acetylcholinrezeptoren, bevorzugt homooligomere Acetylcholinrezeptoren.

30

Zur Herstellung der Polypeptide, die von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodiert werden, können Wirtszellen, die zumindest eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten, unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden. Die gewünschten Polypeptide können danach auf übliche Weise aus den Zellen oder dem Kulturmedium isoliert werden.

35

Weiterhin sind Antikörper Gegenstand der Erfindung, die spezifisch an die vorstehend genannten Polypeptide bzw. Rezeptoren binden. Die Herstellung solcher Antikörper erfolgt auf die übliche Weise. Beispielsweise können solche Antikörper produziert werden durch die Injektion eines substantiell immunkompetenten Wirts mit einer für

5

die Antikörperproduktion effektiven Menge eines erfindungsgemäßen Acetylcholinrezeptor-Polypeptids oder eines Fragments davon und durch nachfolgende Gewinnung dieses Antikörpers. Weiterhin läßt sich in an sich bekannter Weise eine immortalisierte Zelllinie erhalten, die monoklonale Antikörper produziert. Die Antikörper können gegebenenfalls mit einem Nachweisreagenz markiert sein. Bevorzugte Beispiele für ein solches Nachweis-Reagenz sind Enzyme, radioaktiv markierte Elemente, fluoreszierende Chemikalien oder Biotin. Anstelle des vollständigen Antikörpers können auch Fragmente eingesetzt werden, die die gewünschten spezifischen Bindungseigenschaften besitzen.

10

15

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können insbesondere zur Herstellung transgener Invertebraten verwendet werden. Diese können in Testsysteme eingesetzt werden, die auf einer vom Wildtyp abweichenden Expression der erfindungsgemäßen Rezeptoren oder Varianten hiervon basieren. Ferner fallen hierunter sämtliche transgenen Invertebraten, bei denen durch die Modifikation anderer Gene oder Genkontrollsequenzen (Promotoren) eine Veränderung der Expression der erfindungsgemäßen Rezeptoren oder deren Varianten eintritt.

20

25

Die Herstellung der transgenen Invertebraten erfolgt beispielsweise in *Drosophila melanogaster* durch P-Element vermittelten Gentransfer (Hay et al., 1997) oder in *Caenorhabditis elegans* durch Transposon vermittelten Gentransfer (z.B. durch Tc1, Plasterk, 1996).

30

Gegenstand der Erfindung sind somit auch transgene Invertebraten, die zumindest eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten, vorzugsweise transgene Invertebraten der Arten *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans*, sowie deren transgene Nachkommen. Vorzugsweise enthalten die transgenen Invertebraten die erfindungsgemäßen Rezeptoren in einer vom Wildtyp abweichenden Form.

35

5

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können auf die übliche Weise hergestellt werden. Beispielsweise können die Nukleinsäuremoleküle vollständig chemisch synthetisiert werden. Man kann auch nur kurze Stücke der erfindungsgemäßen Sequenzen chemisch synthetisieren und solche Oligonukleotide radioaktiv oder mit einem

10 Fluoreszenzfarbstoff markieren. Die markierten Oligonukleotide können verwendet werden, um ausgehend von Insekten-mRNA hergestellte cDNA-Banken zu durchsuchen. Klone, an die die markierten Oligonukleotide hybridisieren, werden zur Isolierung der betreffenden DNA ausgewählt. Nach der Charakterisierung der isolierten DNA erhält man auf einfache Weise die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren.

15

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können auch mittels PCR-Verfahren unter Verwendung chemisch synthetisierter Oligonukleotide hergestellt werden.

20

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können zur Isolierung und Charakterisierung der regulatorischen Regionen, die natürlicherweise benachbart zu der kodierenden Region vorkommen, verwendet werden. Solche regulatorischen Regionen sind somit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

25

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können neue Wirkstoffe für den Pflanzenschutz, wie Verbindungen, welche als Modulatoren, insbesondere als Agonisten oder Antagonisten, die Leitungseigenschaften der erfindungsgemäßen Acetylcholinrezeptoren verändern, identifiziert werden. Dazu wird ein rekombinantes DNA-Molekül, das zumindest eine erfindungsgemäße Nukleinsäure umfaßt, in eine geeignete Wirtszelle eingebracht. Die Wirtszelle wird in Gegenwart einer Verbindung

30 oder einer Probe, welche eine Vielzahl von Verbindungen umfaßt, unter Bedingungen kultiviert, die die Expression der erfindungsgemäßen Rezeptoren erlauben. Eine Veränderung der Rezeptoreigenschaften kann - wie nachstehend in Beispiel 2 beschrieben - detektiert werden. Auf diese Weise ist es möglich, insektizide Substanzen aufzufinden.

35



5

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ermöglichen auch das Auffinden von Verbindungen, die an die erfindungsgemäßen Rezeptoren binden. Diese können ebenfalls als Insektizide auf Pflanzen angewandt werden. Beispielsweise werden Wirtszellen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten und die entsprechenden Rezeptoren bzw.

10

Polypeptide exprimieren oder die Genprodukte selbst mit einer Verbindung oder einem Gemisch von Verbindungen unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die die Wechselwirkung zumindest einer Verbindung mit den Wirtszellen, den Rezeptoren oder den einzelnen Polypeptiden erlauben.

15

Unter Verwendung von Wirtszellen oder transgenen Invertebraten, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten, ist es auch möglich, Substanzen aufzufinden, welche die Expression der Rezeptoren verändern.

20

Die vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, Vektoren und regulatorischen Regionen können außerdem zum Auffinden von Genen verwendet werden, die für Polypeptide kodieren, welche am Aufbau von funktionell ähnlichen Acetylcholinrezeptoren in Insekten beteiligt sind. Unter funktionell ähnlichen Rezeptoren werden gemäß der vorliegenden Erfindung Rezeptoren verstanden, die Polypeptide umfassen, welche sich zwar hinsichtlich der Aminosäuresequenz von den hierin beschriebenen Polypeptiden unterscheiden, aber im wesentlichen dieselben Funktionen haben.

25

#### **Erläuterungen zum Sequenzprotokoll und zu den Figuren:**

30

SEQ ID NO: 1 zeigt die Nukleotidsequenz der isolierten Da7 cDNA, beginnend mit Position 1 und endend mit Position 2886. SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 2 zeigen ferner die Aminosäuresequenzen des von der Da7 cDNA Sequenz abgeleiteten Proteins.

35

5

SEQ ID NO: 3 zeigt die Nukleotidsequenz der isolierten Hva7-1 cDNA, beginnend mit Position 1 und endend mit Position 3700. SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 4 zeigen ferner die Aminosäuresequenzen des von der Hva7-1 cDNA Sequenz abgeleiteten Proteins.

10

SEQ ID NO: 5 zeigt die Nukleotidsequenz der isolierten Hva7-2 cDNA, beginnend mit Position 1 und endend mit Position 3109. SEQ ID NO: 5 und SEQ ID NO: 6 zeigen ferner die Aminosäuresequenzen des von der Hva7-2 cDNA Sequenz abgeleiteten Proteins.

15

Figur 1 zeigt den Anstieg des intrazellulären Calciums in gentechnisch veränderten Zellen gemäß Beispiel 2 nach Gabe von Nikotin. Zellen wurden mit Fura-2-acetoxymethylester (5 - 10  $\mu$ M in serumfreiem Minimal Essentiellem Medium mit 1 % Rinderserumalbumin and 5 mM Calciumchlorid) beladen, mit N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (5 mM HEPES) gepufferter Tyrode-Lösung gewaschen und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Diaphot) abwechselnd mit Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm bestrahlt. Ein Meßpunkt entspricht einem Paar von Videobildern bei beiden Wellenlängen (Belichtungszeit pro Bild 100 ms). Der Zeitabstand von zwei Meßpunkten beträgt 3 s. Nach Aufnahme von 8 Bildern (Meßpunkt 4.0) wurde Nikotin auf eine Endkonzentration von 500  $\mu$ M zugegeben, und die Meßreihe fortgesetzt. Die Fluoreszenzintensität der Zellen bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 380 nm wurde durch die entsprechende Intensität bei 340 nm geteilt und so das Verhältnis („Ratio“) gebildet.

25

5

**Beispiele:**

**Beispiel 1**

10

Isolierung der beschriebenen Polynukleotidsequenzen

15

Die Manipulation von Polynukleotiden erfolgte nach Standardmethoden der rekombinanten DNA Technologie (Sambrook, et al., 1989). Die bioinformatische Bearbeitung von Nukleotid- und Proteinsequenzen erfolgten mit dem Programmpaket GCG Version 9.1 (GCG Genetics Computer Group, Inc., Madison Wisconsin, USA).

Partielle Polynukleotidsequenzen

20

Aus Proteinsequenzen von Genen, bei denen ihre Fähigkeit homooligomere Acetylcholinrezeptoren auszubilden bekannt war, wurden durch Sequenzvergleiche („Clustalw“) Bereiche identifiziert, aus denen durch Rücktranslation der Codons degenerierte Oligonukleotide abgeleitet wurden. Insgesamt wurden 5 solcher Oligonukleotidpaare für die Polymerasekettenreaktion (PCR) ausgewählt. Nur eine Kombination (vide infra) ergab ein Produkt sowohl aus *Heliothis*-cDNA als auch aus *Drosophila*-cDNA.

25

30

RNA wurde aus gesamten *Heliothis virescens*-Embryonen (kurz vor Schlupf) mittels Trizol-Reagenz (Gibco BRL, nach Angaben des Herstellers) isoliert. In gleicher Weise wurde mit *Drosophila*-Embryonen (24 h bei 25°C) verfahren. 10 µg dieser RNAs wurden in eine cDNA-Erststrangsynthese (Superscript Präamplifizierungssystem für die cDNA-Erststrangsynthese, Gibco BRL, nach Angaben des Herstellers, 45°C Reaktionstemperatur) eingesetzt.

35

5

Anschließend wurden jeweils 1/100 der o.g. Erststrang-cDNA in eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den Oligonukleotiden alpha7-1s: (5'-GAYGTIGAYGARAARAAAYCA-3') und alpha7-2a: (5'-CYYTCRTCIGCRCTRTRTA-3') eingesetzt (Taq DNA Polymerase, rekombinant, Gibco BRL). Die PCR-Parameter waren wie folgt: Hva7-1 und Hva-7-2: 94°C, 2 min; 35 mal (94°C, 45 s; 50°C, 30 s; 72°C, 60 s) sowie Da7: 96°C, 2 min; 35 mal (96°C, 45 s; 50°C, 30 s; 72°C, 60 s). Hieraus ergab sich jeweils eine im Agarosegel (1 %) erkennbare Bande von ca. 0,2 kb sowohl bei Drosophila-cDNA als auch bei Heliothis-cDNA. Nach Subklonierung der DNA-Fragmente mittels SrfScript (Stratagene) und Bestimmung der DNA-Sequenz, zeigte sich, daß aus Heliothis-cDNA zwei verschiedene DNA-Fragmente amplifiziert worden waren; diese waren 228-11 = Hva7-1 (partiell, mit 165 bp) und 228-8 = Hva7-2 (partiell, mit 171 bp). Aus Drosophila-cDNA wurde nur ein DNA-Fragment isoliert; dieses war 248-5 = Da7 (partiell, mit 150 bp).

10

15

20

Isolierung von poly A enthaltender RNA aus Heliothis virescens-Gewebe und Konstruktion der cDNA-Bibliotheken

25

Die RNA für die cDNA-Bibliothek I wurde aus gesamten Heliothis virescens-Embryonen (kurz vor Schlupf) mittels Trizol-Reagenz (Gibco BRL, nach Angaben des Herstellers) isoliert. Die RNA für die cDNA-Bibliothek II wurde aus gesamten Kopfganglien von 500 Heliothis virescens-Larven (Stadien 4-5) mittels Trizol-Reagenz (Gibco BRL, nach Angaben des Herstellers) isoliert. Aus diesen RNAs wurden nun die poly A enthaltenden RNAs durch Reinigung über Dyna Beads 280 (Dyna) isoliert. 5 µg dieser poly A enthaltenden RNAs wurden anschließend in die Konstruktion der cDNA-Bibliotheken I und II mit dem λ-ZAPExpress Vektor eingesetzt (cDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA Synthesis Kit und ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit, alle Stratagene). In Abweichung von den Angaben des Herstellers wurde zur cDNA-Synthese die Reverse Transkriptase Superscript (Gibco BRL) bei einer Synthesetemperatur von 45°C verwendet. Außerdem wurde

30

35

5

auf die Zugabe radioaktiv markierter Desoxynukleosidtriphosphate verzichtet. Desweiteren wurden die synthetisierten cDNAs nicht über das im Kit enthaltene Gelfiltrationsmedium, sondern über Size Sep 400 Spun Columns (Pharmacia) fraktioniert.

10

#### Vollständige Polynukleotidsequenzen

15

Mit Ausnahme der ersten Screening Runde bei der Isolierung des Hva7-1 Klons, erfolgten alle Screens mit Hilfe des DIG Systems (alle Reagenzien und Verbrauchsmaterialien Boehringer Mannheim, nach Angaben im „The DIG System User's Guide for Filter Hybridization“, Boehringer Mannheim). Die eingesetzten DNA-Sonden wurden durch PCR mittels Digoxigenin markiertem dUTP präpariert. Die Hybridisierungen erfolgten in DIG Easy Hyb (Boehringer Mannheim) bei 42°C über Nacht. Der Nachweis markierter DNA auf Nylonmembranen geschah durch Chemolumineszenz (CDP-Star, Boehringer Mannheim) unter Verwendung von Röntgenfilmen (Hyperfilm MP, Amersham). Die isolierten Genbankplasmide wurden zur Identifikation mittels T3 und T7 Primer ansequenziert (ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, ABI, mit ABI Prism 310 Genetic Analyzer). Die Bestimmung der vollständigen Polynukleotidsequenzen in Hva7-1, Hva7-2 und Da7 erfolgte durch Primer Walking mittels Cycle Sequencing als Auftragssequenzierung bei der Firma Qiagen, Hilden.

25

#### a. Isolierung des Da7 Klons

30

$10^6$  Phagen einer Drosophila melanogaster-cDNA-Bibliothek in  $\lambda$  Phagen (Canton-S embryo, 2-14 Stunden, in Uni-ZAP XR Vektor, Stratagene) wurden einem Screening mit DIG markiertem 248-5 als Sonde unterzogen (nach Angaben des Herstellers Stratagene). Die maximale Stringenz beim Waschen der Filter betrug: 0,2 x SSC; 0,1 % SDS; 42°C; 2 x 15 min. Es konnte ein Klon isoliert werden (Klon 432-1), dessen Insert eine Größe von 2940 bp aufwies (Da7, SEQ ID NO: 1). Der größte

35

5 offene Leserahmen dieser Sequenz beginnt bei der Position 372 der dargestellten Sequenz und endet bei Position 1822. Die hieraus abgeleitete Polypeptidsequenz von 770 Aminosäuren (SEQ ID NO: 2) kodiert für ein Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 87,01 kD.

10 b. Isolierung des Hva7-1 Klons

15 In das Screening gingen  $10^6$  Phagen der *Heliothis virescens*-Embryo-cDNA-Bibliothek (Bibliothek I) ein. Die erste von drei Screening Runden fand unter Verwendung  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$  markierter 228-11 DNA als Sonde statt. Die Hybridisierung der Sonde an die Filter erfolgte in Quickhyb (Stratagene) bei 68°C für eine Stunde. Anschließend wurden die Filter zwei mal je 15 min bei Raumtemperatur in 2 x SSC; 0,1 %SDS und 2 mal je 30 min bei 42°C in 0,1xSSC; 0,1 % SDS gewaschen. Die Detektion hybridisierter Sonde erfolgte durch Autoradiographie mit XR Röntgenfilmen (Kodak) unter Verwendung von Verstärkerfolien (Amersham) bei -80°C über Nacht. Die zwei weiteren Screening Runden erfolgten unter Verwendung des DIG-Systems (Boehringer Mannheim).

25 Der in diesem Screen isolierte Klon 241-5 enthielt ein Insert von 3630 bp. Dieses Insert (Hva7-1, SEQ ID NO: 3) besitzt einen längsten offenen Leserahmen, der bei Position 335 der dargestellten Nukleinsäuresequenz beginnt und bei Position 1821 endet. Das hieraus abgeleitete Polypeptid von 496 Aminosäuren (SEQ ID NO: 4) kodiert für ein Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 56,36 kD.

5

c. Isolierung des Hva7-2 Klons

10

In das Screening gingen  $10^6$  Phagen der *Heliothis virescens*-Ganglien-cDNA-Bibliothek (Bibliothek II) ein. Als Sonde wurde Dig markierte 228-8 DNA verwendet. Die maximale Stringenz beim Waschen der Filter betrug: 0,1 x SSC; 0,1% SDS; 42°C; 2 x 15 min.

15

Der in diesem Screen isolierte Klon 241-5 enthielt ein Insert von 3630 bp. Dieses Insert (Hva7-2, SEQ ID NO: 5) besitzt einen längsten offenen Leserahmen, der bei Position 95 der dargestellten Nukleinsäuresequenz beginnt und bei Position 1598 endet. Das hieraus abgeleitete Polypeptid von 501 Aminosäuren (SEQ ID NO: 6) kodiert für ein Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 56,71 kD.

**Beispiel 2**

20

Generierung der Expressionskonstrukte

a. Da7

25

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde der Sequenzbereich von Position 372 bis Position 2681 aus SEQ ID NO: 1 amplifiziert. Hierzu wurden Desoxyoligonukleotide mit den Sequenzen

GCGAATTCACCACCATGAAAAATGCACAACTG sowie

30

CGAGACAATAATATGTGGTGCCTCGAG verwendet. Als DNA-Polymerase wurde die Pfu-Polymerase von Stratagene nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach erfolgter Amplifikation wurde das generierte Stück mit den Restriktionsendonukleasen Eco RI und Xho I verdaut und in einen ebenfalls Eco RI und Xho verdauten Vektor pcDNA3.1/Zeo (Invitrogen) einkloniert.

35

5

b. Hva7-1

10

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde der Sequenzbereich von Position 335 bis Position 1822 aus SEQ ID NO: 3 amplifiziert. Hierzu wurden Desoxyoligonukleotide mit den Sequenzen

GCAAGCTTACCACCATGGGAGGTAGAGCTAGACGCTCGCAC sowie  
GCCTCGAGCGACACCATGATGTGTGGCGC verwendet. Als DNA-Polymerase wurde die Pfu-Polymerase von Stratagene nach Angaben des Herstellers verwendet.

15

Nach erfolgter Amplifikation wurde das generierte Stück mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und Xho I verdaut und in einen ebenfalls HindIII und Xho verdauten Vektor pcDNA3.1/Zeo (Invitrogen) einkloniert.

c. Hva7-2

20

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde der Sequenzbereich von Position 95 bis Position 1597 aus SEQ ID NO: 5 amplifiziert. Hierzu wurden Desoxyoligonukleotide mit den Sequenzen

GCAAGCGCCGCTATGGCCCCTATGTTG sowie

25

TTGCACGATGATATGCGGTGCCTCGAGCG verwendet. Als DNA-Polymerase wurde die Pfu-Polymerase von Stratagene nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach erfolgter Amplifikation wurde das generierte Stück mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und Xho I verdaut und in einen ebenfalls HindIII und Xho verdauten Vektor pcDNA3.1/Zeo (Invitrogen) einkloniert.

30

d.Hva7-1 / 5HT<sub>3</sub> sowie Hva7-2 / 5HT<sub>3</sub> Chimären

35

Durch die Methode der Overlap Extension (Jespersen et al. 1997) wurde jeweils der Bereich von Position 335 bis Position 1036 aus SEQ ID NO: 3 (Hva7-1/5HT<sub>3</sub> Chimäre) sowie der Bereich von Position 95 bis Position 763 aus SEQ ID NO: 5 (Hva7-2/5HT<sub>3</sub> Chimäre) mit dem Bereich von Position 778 bis Position 1521 aus der



5

Mus musculus 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor-cDNA (Sequenz in EMBL Datenbank: M774425) fusioniert. Die beiden Fragmente wurden anschließend mittels TA Cloning (Invitrogen, nach Angaben des Herstellers) in den pcDNA3.1/Zeo Vektor kloniert. Konstrukte mit korrekter Orientierung der beiden Fragmente im Vektor wurden durch Sequenzierung mit dem T7 Primer (Invitrogen) identifiziert.

10

#### Zellkultur und Gentransfer

15

HEK293-Zellen, die die  $\alpha$ -Untereinheit eines L-Typ Ca-Kanals exprimieren (Zong et al. 1995, Stetzer et al. 1996), wurden in Dulbeccos Modified Eagles Medium und 10 % foetalem Kälberserum bei 5 % CO<sub>2</sub> und 20°C bis 37°C kultiviert. Für den Gentransfer wurde FuGENE 6 (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. 24 h bis 48 h nach dem Gentransfer wurden die Zellen in verschiedenen Dichten in Mikrotiterplatten ausgesät. Gentechnisch veränderte Zellen wurden durch Wachstum in Dulbeccos Modified Eagles Medium und 10 % foetalem Kälberserum und 150 - 500 ug/ml Zeocin während 3 bis 4 Wochen selektioniert. Resistente Einzelklone wurden wie unten beschrieben analysiert.

25

#### Fura-2-Messungen

30

Die Veränderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration wurden mit Fura-2 gemessen. Eine Stammlösung mit 2 mM Fura-2-acetoxymethylester (Sigma) in Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde auf eine Endkonzentration von 5 - 10  $\mu$ M in serumfreiem Minimal Essentiellem Medium (MEM, Gibco) mit 1% Rinderserumalbumin and 5 mM Calciumchlorid verdünnt. Die Zellen wurden in einer Mikrotiterplatte in dieser Lösung 45 bis 60 min lang inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (5 mM HEPES) gepufferter Tyrode-Lösung (HEPES-gepufferte Salzlösung mit 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM

35

5

Glucose) gewaschen. 100 µl Tyrodepuffer wurde in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben und die Zellen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Diaphot) abwechselnd mit Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm bestrahlt. Eine Serie von Videobildern (Belichtungszeit pro Bild 100 ms) wurde mit Pausen von 3 Sekunden aufgenommen und als digitalisierte Bilder in einem Bildanalyse-Computer gespeichert (Leica, Quantimet 570). Nach Aufnahme von 8 Bildern (Meßpunkt 4.0 in Fig. 1) wurde Nikotin auf eine Endkonzentration von 500 µM zugegeben, und die Meßreihe fortgesetzt. Die Fluoreszenzintensität der Zellen bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 380 nm wurde durch die entsprechende Intensität bei 340 nm geteilt und so ein Verhältnis gebildet, das den relativen Anstieg der Calcium-Konzentration darstellt (Grynkiewicz et al. 1985).

15

**Literatur:**

20

Bossy et al. (1988) Conservation of neural nicotinic acetylcholine receptors from *Drosophila* to vertebrate central nervous systems, EMBO J. 7, 611-618

Breer et al. (1987) Molecular properties and functions of insect acetylcholine receptors, J. Insect Physiol. 33, 771-790

25

Buckingham et al. (1997) Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors, J.Exp. Biol. 200, 2685-2692

30

Changeux et al. (1992) The functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor explored by affinity labelling and site-directed mutagenesis, Quarterly Review of Biophysics 25, 395-432

35

Claudio et al. (1983) Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Torpedo californica* acetylcholine receptor  $\alpha$  subunit, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1111-1115

5

Devillers-Thiery et al. (1983) Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding  $\alpha$ -subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2067-2071

10

Elgoyhen et al. (1997) US Pat. No. 5,683,912

Eastham et al. (1998) Characterisation of a nicotinic acetylcholine receptor from the insect *Manduca sexta*, Eur. J. Neurosci 10, 879-889

15

Grynkiewicz et al. (1985) A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties, J Biol Chem. 260, 3440-3450

20

Hay et al. (1997), P element insertion-dependent gene activation in the *Drosophila* eye, Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America 94 (10), 5195-5200

25

Hermans-Borgmeyer et al. (1986) Primary structure of a developmentally regulated nicotinic acetylcholine receptor protein from *Drosophila* EMBO J. 5, 1503-1508

Heinemann et al. (1997) US Pat. No 5,591,590

30

Jespersen et al. (1997) Efficient Non-PCR-Mediated Overlap Extension of PCR Fragments by Exonuclease „End Polishing“, Biotechniques, 23, 48-52

Lindstrom et al. (1997) US Pat. No. 5,599,709

Marshall et al. (1990) Sequence and functional expression of a single  $\alpha$  subunit of an insect nicotinic acetylcholine receptor, EMBO J. 9, 4391-4398

35

5

Noda et al. (1982), Primary structure of  $\alpha$ -subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence, *Nature* 299, 793-797

10

Noda et al. (1983a), Primary structures of  $\beta$ - and  $\delta$ -subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences, *Nature* 301, 251-255

Noda et al. (1983a), Structural homology of *Torpedo californica* acetylcholine receptor subunits, *Nature* 302, 528-532

15

Ortells et al. (1995), Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors, *Trends in Neuroscience* 18, 121-127

20

Plasterk (1996), The Tc1/mariner transposon family, *Transposable Elements/Current Topics in Microbiology and Immunology* 204, 125-143

Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbour Press

25

Sawruk et al. (1990a), *EMBO J.* 9, 2671-2677 Heterogeneity of *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptors: SAD, a novel developmentally regulated  $\alpha$ -subunit

30

Sawruk et al. (1990b), SBD, a novel structural subunit of the *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptor, shares its genomic localization with two  $\alpha$ -subunits, *FEBS Lett.* 273, 177-181

35

Schloß et al. (1988), Neuronal acetylcholine receptors of *Drosophila*: the ARD protein is a component of a high-affinity  $\alpha$ -bungarotoxin binding complex, *EMBO J.* 7, 2889-2984

5

Stetzer et al. (1996) Stable expression in HEK-293 cells of the rat  $\alpha 3/\beta 4$  subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptor, FEBS Lett. 397, 39-44

10

Zong et al. (1995) On the regulation of the expressed L-type calcium channel by cAMP-dependent phosphorylation, Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. 430, 340-347.

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Bayer Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Bayerwerk
- (C) ORT: Leverkusen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D 51368

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Nukleinsäuren, die für  
Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten von Insekten kodieren

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2886 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Drosophila melanogaster

## (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON(E): Da7

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 372..2681

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GGCACGAGAA AAAGTTGTGG TATAAACTTT TATTGTAGGA AAACGCATAA AAATAATAGA	60
AAAACGCTCT TCGGGTTGTA AAGAAAATAA GAAGACAAAA GAAAGACATG AAAACGTTGC	120
AAACAATAAA GCATATACTT GCCATATTGA TATAAAGGGA AATCGTGAAA AGGCGGTGAA	180
AATTTTCGTAA GATTAGTTGG TATTAAGGGC AGCCCATGCA CACAGCTAAA AAGGGA ACTA	240

AAAAAACCCC GCACAGAACA ATGAAAGCTG CAGCAGCTGG ATAAGGCCGA CAAAACCGAA	300
AATTATATTA TTGTAATCTA GTAGAGAGCA GACAACATAT CCGCTGGCAA CAACCAACAC	360
CGAAAGAGAC T ATG AAA AAT GCA CAA CTG AAA CTG ACT GAA GTT GAC GAT Met Lys Asn Ala Gln Leu Lys Leu Thr Glu Val Asp Asp 1 5 10	410
GAT GAG CTG TGG CTG GCA GTA AGA TTA GCG CAC TGC AGC AGC AAC TTT Asp Glu Leu Trp Leu Ala Val Arg Leu Ala His Cys Ser Ser Asn Phe 15 20 25	458
AGC AGC AGT AGC AGC ACA AGA ACC ACC AGC AGC AAC CAG AGG CAC AAC Ser Ser Ser Ser Ser Thr Arg Thr Thr Ser Ser Asn Gln Arg His Asn 30 35 40 45	506
CAG CAA CTC ACA ACA CTG CAA CCA AGG AGC TTA AGT ACA AAA CAC CAC Gln Gln Leu Thr Thr Leu Gln Pro Arg Ser Leu Ser Thr Lys His His 50 55 60	554
AGC AAC ATT GCA AGC GAG CAG CAC AAT AGC CAG CAA CAG GAG CCA GCA Ser Asn Ile Ala Ser Glu Gln His Asn Ser Gln Gln Gln Glu Pro Ala 65 70 75	602
TCG AAG GAC GAG GAT GTA GCC AAC CAC GGT AGA AGC AAT GAC CAG CAG Ser Lys Asp Glu Asp Val Ala Asn His Gly Arg Ser Asn Asp Gln Gln 80 85 90	650
ACG CAT CTG CAA CAG CTA GAC AGC AGC AAC ATG TTG TCG CCA AAG ACA Thr His Leu Gln Gln Leu Asp Ser Ser Asn Met Leu Ser Pro Lys Thr 95 100 105	698
GCC GCA GCA GCA ACT GCT GCC GGC GAT GAA GCA ACA ACC CAA CAA CCA Ala Ala Ala Ala Thr Ala Ala Gly Asp Glu Ala Thr Thr Gln Gln Pro 110 115 120 125	746
ACA AAC ATA AGA CTG TGT GCA CGC AAG CGA CAA CGA TTG CGT CGC CGA Thr Asn Ile Arg Leu Cys Ala Arg Lys Arg Gln Arg Leu Arg Arg Arg 130 135 140	794
CGA AAA AGA AAA CCA GCA ACC CCA AAC GAA ACA GAT ATC AAG AAA CAA Arg Lys Arg Lys Pro Ala Thr Pro Asn Glu Thr Asp Ile Lys Lys Gln 145 150 155	842
CAG CAA CTT AGC ATG CCT CCC TTC AAA ACG CGC AAA TCC ACG GAC ACC Gln Gln Leu Ser Met Pro Pro Phe Lys Thr Arg Lys Ser Thr Asp Thr 160 165 170	890
TAC AGC ACA CCA GCA GCA ACA ACC AGC TGT CCG ACA GCC ACC TAC ATG Tyr Ser Thr Pro Ala Ala Thr Thr Ser Cys Pro Thr Ala Thr Tyr Met 175 180 185	938
CAA TGT CGA GCC AGC GAC AAT GAG TTC AGT ATT CCG ATA TCG AGA CAT Gln Cys Arg Ala Ser Asp Asn Glu Phe Ser Ile Pro Ile Ser Arg His 190 195 200 205	986
GAT AGA GTA TCC ACG GCC ACA TTC GCC TGG GTG TTG CAT GTG CTG CAG Asp Arg Val Ser Thr Ala Thr Phe Ala Trp Val Leu His Val Leu Gln 210 215 220	1034
GTG CTG CTC GTG TCG CTG CAA CAG TGG CAA CTT CAC GTG CAA CAG CGA Val Leu Leu Val Ser Leu Gln Gln Trp Gln Leu His Val Gln Gln Arg 225 230 235	1082
TCG GTG CTA CTG TTC AGA AGG ATC GCA GCG AGC ACC ATC GCC TTC ATT Ser Val Leu Leu Phe Arg Arg Ile Ala Ala Ser Thr Ile Ala Phe Ile 240 245 250	1130

TCC Ser	TAT Tyr 255	TTA Leu	GGC Gly	AGC Ser	TTT Phe	GCA Ala 260	GCG Ala	CAA Gln	CTG Leu	AAA Lys	AAT Asn 265	AGC Ser	AGC Ser	AGC Ser	AGC Ser	1178
AGT Ser 270	AGC Ser	AGC Ser	AGC Ser	AAC Asn	AGC Ser 275	AGC Ser	AAC Asn	AAC Asn	AGC Ser	AGC Ser 280	ACG Thr	CAA Gln	ATA Ile	TTA Leu	AAC Asn 285	1226
GGA Gly	CTT Leu	AAT Asn	AAA Lys	CAC His 290	TCA Ser	TGG Trp	ATA Ile	TTT Phe	TTA Leu 295	TTG Leu	ATA Ile	TAT Tyr	TTG Leu	AAT Asn 300	TTA Leu	1274
TCT Ser	GCT Ala	AAA Lys	GTT Val 305	TGC Cys	CTA Leu	GCA Ala	GGA Gly	TAT Tyr 310	CAT His	GAA Glu	AAG Lys	AGA Arg	CTG Leu 315	TTA Leu	CAC His	1322
GAT Asp	CTT Leu	TTG Leu 320	GAT Asp	CCT Pro	TAT Tyr	AAT Asn	ACA Thr 325	CTA Leu	GAA Glu	CGT Arg	CCC Pro	GTT Val 330	CTC Leu	AAT Asn	GAA Glu	1370
TCG Ser 335	GAC Asp	CCG Pro	TTA Leu	CAA Gln	TTA Leu	AGC Ser 340	TTT Phe	GGT Gly	TTA Leu	ACT Thr	TTA Leu 345	ATG Met	CAA Gln	ATT Ile	ATC Ile	1418
GAT Asp 350	GTG Val	GAC Asp	GAG Glu	AAA Lys	AAT Asn 355	CAA Gln	TTG Leu	CTA Leu	GTC Val	ACT Thr 360	AAT Asn	GTG Val	TGG Trp	TTA Leu	AAA Lys 365	1466
CTG Leu	GAG Glu	TGG Trp	AAC Asn	GAC Asp 370	ATG Met	AAT Asn	CTC Leu	CGC Arg	TGG Trp 375	AAC Asn	ACC Thr	TCC Ser	GAC Asp	TAT Tyr 380	GGC Gly	1514
GGA Gly	GTT Val	AAG Lys	GAT Asp 385	CTG Leu	CGA Arg	ATA Ile	CCG Pro	CCG Pro 390	CAT His	CGC Arg	ATC Ile	TGG Trp	AAG Lys 395	CCG Pro	GAC Asp	1562
GTG Val	CTG Leu	ATG Met 400	TAC Tyr	AAC Asn	AGT Ser	GCG Ala	GAT Asp 405	GAG Glu	GGA Gly	TTT Phe	GAC Asp	GGC Gly 410	ACC Thr	TAC Tyr	CAG Gln	1610
ACG Thr 415	AAC Asn	GTG Val	GTG Val	GTG Val	CGG Arg	AAC Asn 420	AAC Asn	GGC Gly	TCG Ser	TGT Cys	CTA Leu 425	TAC Tyr	GTT Val	CCG Pro	CCG Pro	1658
GGG Gly 430	ATC Ile	TTC Phe	AAG Lys	TCG Ser	ACG Thr 435	TGC Cys	AAG Lys	ATC Ile	GAC Asp	ATC Ile 440	ACG Thr	TGG Trp	TTC Phe	CCC Pro	TTC Phe 445	1706
GAT Asp	GAC Asp	CAG Gln	CGG Arg	TGC Cys 450	GAG Glu	ATG Met	AAG Lys	TTC Phe	GGC Gly 455	AGT Ser	TGG Trp	ACC Thr	TAC Tyr	GAC Asp 460	GGA Gly	1754
TTC Phe	CAG Gln	CTG Leu	GAT Asp 465	TTA Leu	CAA Gln	TTA Leu	CAA Gln	GAT Asp 470	GAA Glu	ACT Thr	GGC Gly	GGT Gly	GAT Asp 475	ATC Ile	AGC Ser	1802
AGT Ser	TAC Tyr	GTG Val 480	CTC Leu	AAC Asn	GGC Gly	GAG Glu	TGG Trp 485	GAA Glu	CTA Leu	CTG Leu	GGT Gly	GTG Val 490	CCC Pro	GGC Gly	AAA Lys	1850
CGT Arg 495	AAC Asn	GAG Glu	ATC Ile	TAT Tyr	TAC Tyr	AAC Asn 500	TGC Cys	TGC Cys	CCG Pro	GAA Glu	CCC Pro 505	TAT Tyr	ATA Ile	GAC Asp	ATC Ile	1898
ACC Thr 510	TTC Phe	GCC Ala	ATC Ile	ATC Ile	ATC Ile 515	CGC Arg	CGA Arg	CGA Arg	ACA Thr	CTG Leu 520	TAC Tyr	TAT Tyr	TTC Phe	TTC Phe	AAC Asn 525	1946



[illegible]

TAATACATCC AAGAAAAACC AAAACAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA

2886

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 770 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Lys	Asn	Ala	Gln	Leu	Lys	Leu	Thr	Glu	Val	Asp	Asp	Asp	Glu	Leu	1	5	10	15
Trp	Leu	Ala	Val	Arg	Leu	Ala	His	Cys	Ser	Ser	Asn	Phe	Ser	Ser	Ser	20	25	30	
Ser	Ser	Thr	Arg	Thr	Thr	Ser	Ser	Asn	Gln	Arg	His	Asn	Gln	Gln	Leu	35	40	45	
Thr	Thr	Leu	Gln	Pro	Arg	Ser	Leu	Ser	Thr	Lys	His	His	Ser	Asn	Ile	50	55	60	
Ala	Ser	Glu	Gln	His	Asn	Ser	Gln	Gln	Gln	Glu	Pro	Ala	Ser	Lys	Asp	65	70	75	80
Glu	Asp	Val	Ala	Asn	His	Gly	Arg	Ser	Asn	Asp	Gln	Gln	Thr	His	Leu	85	90	95	
Gln	Gln	Leu	Asp	Ser	Ser	Asn	Met	Leu	Ser	Pro	Lys	Thr	Ala	Ala	Ala	100	105	110	
Ala	Thr	Ala	Ala	Gly	Asp	Glu	Ala	Thr	Thr	Gln	Gln	Pro	Thr	Asn	Ile	115	120	125	
Arg	Leu	Cys	Ala	Arg	Lys	Arg	Gln	Arg	Leu	Arg	Arg	Arg	Arg	Lys	Arg	130	135	140	
Lys	Pro	Ala	Thr	Pro	Asn	Glu	Thr	Asp	Ile	Lys	Lys	Gln	Gln	Gln	Leu	145	150	155	160
Ser	Met	Pro	Pro	Phe	Lys	Thr	Arg	Lys	Ser	Thr	Asp	Thr	Tyr	Ser	Thr	165	170	175	
Pro	Ala	Ala	Thr	Thr	Ser	Cys	Pro	Thr	Ala	Thr	Tyr	Met	Gln	Cys	Arg	180	185	190	
Ala	Ser	Asp	Asn	Glu	Phe	Ser	Ile	Pro	Ile	Ser	Arg	His	Asp	Arg	Val	195	200	205	
Ser	Thr	Ala	Thr	Phe	Ala	Trp	Val	Leu	His	Val	Leu	Gln	Val	Leu	Leu	210	215	220	
Val	Ser	Leu	Gln	Gln	Trp	Gln	Leu	His	Val	Gln	Gln	Arg	Ser	Val	Leu	225	230	235	240
Leu	Phe	Arg	Arg	Ile	Ala	Ala	Ser	Thr	Ile	Ala	Phe	Ile	Ser	Tyr	Leu	245	250	255	
Gly	Ser	Phe	Ala	Ala	Gln	Leu	Lys	Asn	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	260	265	270	
Ser	Asn	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Ser	Thr	Gln	Ile	Leu	Asn	Gly	Leu	Asn	275	280	285	

Lys His Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ile Tyr Leu Asn Leu Ser Ala Lys  
 290 295 300  
 Val Cys Leu Ala Gly Tyr His Glu Lys Arg Leu Leu His Asp Leu Leu  
 305 310 315 320  
 Asp Pro Tyr Asn Thr Leu Glu Arg Pro Val Leu Asn Glu Ser Asp Pro  
 325 330 335  
 Leu Gln Leu Ser Phe Gly Leu Thr Leu Met Gln Ile Ile Asp Val Asp  
 340 345 350  
 Glu Lys Asn Gln Leu Leu Val Thr Asn Val Trp Leu Lys Leu Glu Trp  
 355 360 365  
 Asn Asp Met Asn Leu Arg Trp Asn Thr Ser Asp Tyr Gly Gly Val Lys  
 370 375 380  
 Asp Leu Arg Ile Pro Pro His Arg Ile Trp Lys Pro Asp Val Leu Met  
 385 390 395 400  
 Tyr Asn Ser Ala Asp Glu Gly Phe Asp Gly Thr Tyr Gln Thr Asn Val  
 405 410 415  
 Val Val Arg Asn Asn Gly Ser Cys Leu Tyr Val Pro Pro Gly Ile Phe  
 420 425 430  
 Lys Ser Thr Cys Lys Ile Asp Ile Thr Trp Phe Pro Phe Asp Asp Gln  
 435 440 445  
 Arg Cys Glu Met Lys Phe Gly Ser Trp Thr Tyr Asp Gly Phe Gln Leu  
 450 455 460  
 Asp Leu Gln Leu Gln Asp Glu Thr Gly Gly Asp Ile Ser Ser Tyr Val  
 465 470 475 480  
 Leu Asn Gly Glu Trp Glu Leu Leu Gly Val Pro Gly Lys Arg Asn Glu  
 485 490 495  
 Ile Tyr Tyr Asn Cys Cys Pro Glu Pro Tyr Ile Asp Ile Thr Phe Ala  
 500 505 510  
 Ile Ile Ile Arg Arg Arg Thr Leu Tyr Tyr Phe Phe Asn Leu Ile Ile  
 515 520 525  
 Pro Cys Val Leu Ile Ala Ser Met Ala Leu Leu Gly Phe Thr Leu Pro  
 530 535 540  
 Pro Asp Ser Gly Glu Lys Leu Ser Leu Gly Val Thr Ile Leu Leu Ser  
 545 550 555 560  
 Leu Thr Val Phe Leu Asn Met Val Ala Glu Thr Met Pro Ala Thr Ser  
 565 570 575  
 Asp Ala Val Pro Leu Trp Ile Arg Ile Val Phe Leu Cys Trp Leu Pro  
 580 585 590  
 Trp Ile Leu Arg Met Ser Arg Pro Gly Arg Pro Leu Ile Leu Glu Phe  
 595 600 605  
 Pro Thr Thr Pro Cys Ser Asp Thr Ser Ser Glu Arg Lys His Gln Ile  
 610 615 620  
 Leu Ser Asp Val Glu Leu Lys Glu Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Ala  
 625 630 635 640  
 Asn Val Leu Asp Ile Asp Asp Asp Phe Arg His Asn Cys Arg Pro Met

[illegible]

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 3700 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: *Heliothis virescens*
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
  - (B) CLON(E): Hva7-1
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
  - (B) LÄNGE: 335..1822

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GGCACGAGCC	GCTGCCCCAC	GGTCGGCCGC	ACTCCGCTGA	ACAACAATGC	TCAAAAAACAC	60
GCCGTGACTC	CACACACATC	CCCTCGGCGC	AGTAGGCGAT	GTTTGAGGAT	CGGACGGCAC	120
GCGTGGCCGT	CGGCGAGCGG	TCGTGAACAA	GTTGCATACA	TATGAAAACC	GTAAAAAGAT	180
TGAATTTTAA	GCCGATCGTG	TTCGATAGAT	CCTAATAGAG	AAGCGGGAGT	GCGGCGTTTG	240
GTAGGCGGGG	GTCGAGTCGC	GCGGTCGGGG	GAAATGGCGC	GGCGCGGGGC	GGCGGCGGCG	300
GCGGCGGCGG	GCGGCGGCGG	GTCGCGGCGC	TGAC	ATG	GGC	GGG
				CGG	GCG	CGC
				Met	Gly	Gly
				Arg	Ala	Arg
						775

CGC	TCG	CAC	TTG	GCG	GCG	CCC	GCG	GGC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	TGC	CTG	400
Arg	Ser	His	Leu	Ala	Ala	Pro	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	
			780					785					790			
CTC	TGG	CCG	AGG	GGG	GCA	CGC	TGC	GGG	TAC	CAC	GAG	AAG	CGG	CTA	CTG	448
Leu	Trp	Pro	Arg	Gly	Ala	Arg	Cys	Gly	Tyr	His	Glu	Lys	Arg	Leu	Leu	
			795				800					805				
CAC	CAC	CTA	TTG	GAC	CAC	TAC	AAC	GTA	CTG	GAG	AGG	CCC	GTC	GTC	AAC	496
His	His	Leu	Leu	Asp	His	Tyr	Asn	Val	Leu	Glu	Arg	Pro	Val	Val	Asn	
		810				815					820					
GAG	AGC	GAC	CCG	CTG	CAG	CTC	TCC	TTC	GGC	CTC	ACG	CTC	ATG	CAG	ATC	544
Glu	Ser	Asp	Pro	Leu	Gln	Leu	Ser	Phe	Gly	Leu	Thr	Leu	Met	Gln	Ile	
					830					835					840	
ATC	GAC	GTG	GAC	GAG	AAG	AAC	CAG	CTT	TTA	ATA	ACA	AAC	ATC	TGG	CTA	592
Ile	Asp	Val	Asp	Glu	Lys	Asn	Gln	Leu	Leu	Ile	Thr	Asn	Ile	Trp	Leu	
				845				850						855		
AAA	CTA	GAG	TGG	AAT	GAT	ATG	AAC	TTG	AGG	TGG	AAC	ACT	TCA	GAT	TTC	640
Lys	Leu	Glu	Trp	Asn	Asp	Met	Asn	Leu	Arg	Trp	Asn	Thr	Ser	Asp	Phe	
			860					865					870			
GGC	GGG	GTC	AAA	GAT	TTA	AGA	GTG	CCA	CCC	CAC	AGA	CTA	TGG	AAA	CCA	688
Gly	Gly	Val	Lys	Asp	Leu	Arg	Val	Pro	Pro	His	Arg	Leu	Trp	Lys	Pro	
			875				880					885				
GAC	GTC	CTT	ATG	TAC	AAC	AGC	GCG	GAC	GAA	GGG	TTC	GAC	AGC	ACG	TAT	736
Asp	Val	Leu	Met	Tyr	Asn	Ser	Ala	Asp	Glu	Gly	Phe	Asp	Ser	Thr	Tyr	
			890			895					900					
CCA	ACG	AAC	GTG	GTG	GTG	CGG	AAC	AAC	GGC	TCG	TGT	CTG	TAC	GTG	CCG	784
Pro	Thr	Asn	Val	Val	Val	Arg	Asn	Asn	Gly	Ser	Cys	Leu	Tyr	Val	Pro	
					910					915					920	
CCC	GGC	ATC	TTC	AAG	AGC	ACC	TGC	AAG	ATC	GAC	ATC	ACC	TGG	TTC	CCC	832
Pro	Gly	Ile	Phe	Lys	Ser	Thr	Cys	Lys	Ile	Asp	Ile	Thr	Trp	Phe	Pro	
				925					930					935		
TTC	GAC	GAC	CAA	CGA	TGC	GAG	ATG	AAG	TTT	GGC	AGC	TGG	ACT	TAT	GAT	880
Phe	Asp	Asp	Gln	Arg	Cys	Glu	Met	Lys	Phe	Gly	Ser	Trp	Thr	Tyr	Asp	
			940					945					950			
GGT	TAT	CAG	TTG	GAT	CTA	CAA	CTA	CAG	GAT	GAA	GGG	GGC	GGA	GAT	ATA	928
Gly	Tyr	Gln	Leu	Asp	Leu	Gln	Leu	Gln	Asp	Glu	Gly	Gly	Gly	Asp	Ile	
			955				960					965				
AGC	AGT	TTT	GTC	ACG	AAT	GGC	GAA	TGG	GAG	TTA	ATA	GGA	GTC	CCC	GGC	976
Ser	Ser	Phe	Val	Thr	Asn	Gly	Glu	Trp	Glu	Leu	Ile	Gly	Val	Pro	Gly	
			970			975					980					
AAG	CGC	AAC	GAG	ATC	TAC	TAC	AAC	TGT	TGT	CCG	GAG	CCA	TAC	ATC	GAC	1024
Lys	Arg	Asn	Glu	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Cys	Cys	Pro	Glu	Pro	Tyr	Ile	Asp	
					990					995					1000	
ATC	ACG	TTT	GCG	GTG	GTG	ATC	CGG	AGG	AAA	ACG	CTC	TAC	TAC	TTC	TTC	1072
Ile	Thr	Phe	Ala	Val	Val	Ile	Arg	Arg	Lys	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Phe	Phe	
				1005					1010					1015		
AAT	CTG	ATC	GTG	CCC	TGC	GTG	CTC	ATC	GCC	TCC	ATG	GCT	CTA	TTG	GGG	1120
Asn	Leu	Ile	Val	Pro	Cys	Val	Leu	Ile	Ala	Ser	Met	Ala	Leu	Leu	Gly	
			1020					1025					1030			
TTC	ACC	TTG	CCT	CCA	GAC	TCC	GGA	GAA	AAG	TTG	TCT	TTA	GGT	GTG	ACG	1168
Phe	Thr	Leu	Pro	Pro	Asp	Ser	Gly	Glu	Lys	Leu	Ser	Leu	Gly	Val	Thr	
			1035				1040						1045			

ATA TTA CTG TCG TTG ACG GTG TTC CTC AAC ATG GTG GCG GAG ACG ATG Ile Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Leu Asn Met Val Ala Glu Thr Met 1050 1055 1060	1216
CCA GCG ACG TCG GAC GCC GTG CCC TTG CTC GGC ACC TAC TTC AAC TGC Pro Ala Thr Ser Asp Ala Val Pro Leu Leu Gly Thr Tyr Phe Asn Cys 1065 1070 1075 1080	1264
ATC ATG TTC ATG GTG GCT TCC TCC GTC GTC TCC ACC ATA CTG ATC CTC Ile Met Phe Met Val Ala Ser Ser Val Val Ser Thr Ile Leu Ile Leu 1085 1090 1095	1312
AAC TAC CAC CAC CGG CAC GCA GAC ACT CAC GAA ATG AGT GAT TGG ATT Asn Tyr His His Arg His Ala Asp Thr His Glu Met Ser Asp Trp Ile 1100 1105 1110	1360
CGT TGC GTG TTC CTT TAT TGG CTG CCG TGG GTG CTG CGC ATG TCA CGG Arg Cys Val Phe Leu Tyr Trp Leu Pro Trp Val Leu Arg Met Ser Arg 1115 1120 1125	1408
CCC GGC TCG GCG ACG ACG CCG CCG CCG GCG CGC GTA CCT CCG CCG CCG Pro Gly Ser Ala Thr Thr Pro Pro Pro Ala Arg Val Pro Pro Pro Pro 1130 1135 1140	1456
GAC CTG GAG CTG CGC GAG CGC TCC TCC AAG TCG CTC CTA GCG AAC GTG Asp Leu Glu Leu Arg Glu Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Ala Asn Val 1145 1150 1155 1160	1504
CTC GAC ATC GAT GAC GAC TTC CGC CAC CCG CAA GCG CAG CAG CCG CAA Leu Asp Ile Asp Asp Asp Phe Arg His Pro Gln Ala Gln Gln Pro Gln 1165 1170 1175	1552
TGC TGC CGA TAC TAC AGG GGG GGT GAG GAG AAT GGC GCG GGG TTG GCG Cys Cys Arg Tyr Tyr Arg Gly Gly Glu Glu Asn Gly Ala Gly Leu Ala 1180 1185 1190	1600
GCG CAC AGT TGC TTC GGT GTC GAC TAC GAG CTC TCC CTC ATT CTG AAG Ala His Ser Cys Phe Gly Val Asp Tyr Glu Leu Ser Leu Ile Leu Lys 1195 1200 1205	1648
GAG ATT AGA GTC ATC ACA GAT CAG ATG CGC AAG GAC GAC GAA GAT GCG Glu Ile Arg Val Ile Thr Asp Gln Met Arg Lys Asp Asp Glu Asp Ala 1210 1215 1220	1696
GAC ATT TCG CGC GAC TGG AAG TTC GCC GCC ATG GTC GTG GAC AGA CTG Asp Ile Ser Arg Asp Trp Lys Phe Ala Ala Met Val Val Asp Arg Leu 1225 1230 1235 1240	1744
TGC CTT ATT ATC TTT ACC CTG TTC ACA ATC ATC GCC ACG CTA GCC GTG Cys Leu Ile Ile Phe Thr Leu Phe Thr Ile Ile Ala Thr Leu Ala Val 1245 1250 1255	1792
CTG CTG TCC GCG CCA CAC ATC ATG GTG TCG TAGCGACCCG CCCGCTTGCG Leu Leu Ser Ala Pro His Ile Met Val Ser 1260 1265	1842
GATACGCATG CGAAAAGTTC TGTGATACCG CGAATATTTG TTAAGTTGTG ATGAGCGAAG	1902
TGGCGCGGAC GGTGACGCCG CGGCGTCGGA GTTGCCGCCG CCTGCCTCGC CGCCCGCGCC	1962
CCCCTGTAGA CATAAGTTAC CGCTGACTGC CAACCCTGTA CGTTCAACAA ATAAGTCCCC	2022
ATCCGACTAA CGTCTTTTAT CCCCTTGAAA AATTCAGCGA TTGTGTACCC CTTTCTTCCA	2082
AGAATACAAT GACAAATGGT CGTCACGCTC AGTGGAATCA ATCCCGTACT CTTCGCCCGA	2142
TATTTCCCTT AGGGTATGTC ACGAGTTTGA ATGAGCGGTT CCGTATCAGA CGTTCCGTCC	2202

CCGGAACGGT	CGTCCCCTGC	GATAAAGTGG	CAGTACGTGC	TATACAGGCA	CTTAAGGCCG	2262
CCACGCCACG	GCGCCGCGGT	GCGCTCGGGC	CGCGAACCCG	CGACCCTCAC	CGCTGCAAGT	2322
GGCCACCCAC	TAGACAAGAC	TGCGGCAGAA	AATATTTGCA	CAAAAACGTC	TTCTTCTTA	2382
CCGATGAACG	ACCTGATTCTG	CATTTAAAAAT	TAAACTTTGT	TAGAACTTCT	TCGATTCTTG	2442
AAATCTATTG	TACAGTTTAG	AGTTTGGGCG	GTGAAACAAT	GGCCCTTTGT	TTCTTCTTG	2502
TTGATTCCA	TGAATCGTGG	TTATAATCCC	TAGTTTTATT	TTGCGATATA	TTTGTGTCAG	2562
TAGCTAGTAT	AGAACTTTAC	AAACAATGTT	GATTCAATTG	GTACAGGTTG	TGATATGCCT	2622
CGTTGTGAAC	GGGTCCGATA	TTGTTATAAA	TGGTAAAATA	CCCATGGCTA	TAGCTTAATA	2682
AATCGTTCGT	TAAAAGTTGT	AGTTAAACAA	ATATTATTTT	AATAAAGTCA	TATCTGGGTC	2742
TTCCGGAACG	ACTTTTACAA	ATAATTAAAT	TACATATTAA	TATCACGTTT	GTACTTCTTT	2802
CCATACAGTT	ACAGTAATTC	GTATGCTGAA	AATAATATTA	GCTTGTAATA	TTTTCTTCTT	2862
CGAAAATTTA	TTCAAACAGA	TGCGACCATC	GTTTCAAACA	TTTACATGTA	ATATAGAACT	2922
CATTTTATAA	GATATACAAC	ATTTTATAAG	TACAAGAAGT	TGTAACATGA	ACCGGTTTTT	2982
CGTTACATAG	AGGGTATAAC	ACAAAGGTGC	CTACATATTG	ACAGATGCGA	AGCACGATCA	3042
GTTGATAAGC	ACAGGTACAC	TATATCCTGA	CATCCGACAG	TCCTGCCGCT	CGTCTGCCAC	3102
ACTCGGAAAC	ATTCGACAGT	TCAGTTTACT	GCTCCGCCAT	CATCGATTGT	TAAGTTTGTT	3162
GTTCTAACTC	ATCGCATTCA	TTTCATTCAA	AAACATTGTA	AACCTCTCAA	GGGGAAAACG	3222
TGTTGTAAAC	AGTGAGAGTG	CGCGGGTACA	ACCGACACGC	GAATGTACCC	TCGCAAGGCT	3282
CCTGTAATGT	TTTCTCTTC	CGAGGTGTTG	CTGAGAGTAA	TCTTAGACGG	TCCGATGGAA	3342
GTTGCGGACC	GGATATGATT	ACAAGTCAAT	GTTTTTAAGT	CATCCGTTTA	TTTATTGTTA	3402
TATCTTCTTA	CCATTGCTA	GAGGTGTGT	GACGACCCGG	ACGGTGGGCG	CCGCAACCCG	3462
CACACGCGGG	GTTCCATCTT	TGTATTAGAT	GGAAGTTGTG	CGGCATCTCT	CCGTCGGCAA	3522
TGGGACAACC	CGTTGTCCCC	AACATTTGTT	CAATTGTTAG	GGTAACTCT	GAATTGCACT	3582
TTGTTTATTA	AATATAAACG	AATGAAACAA	AAAAAAAAAA	AAAAAACTCG	AGAGTACTTC	3642
TAGAGCGGCC	GCGGGCCCAT	CGATTTTCCA	CCCGGGTGGG	GTACCAGTAA	GTGTACCC	3700

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 496 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Gly Gly Arg Ala Arg Arg Ser His Leu Ala Ala Pro Ala Gly Leu  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Cys Leu Leu Trp Pro Arg Gly Ala Arg Cys Gly Tyr  
 20 25 30

His Glu Lys Arg Leu Leu His His Leu Leu Asp His Tyr Asn Val Leu  
 35 40 45  
 Glu Arg Pro Val Val Asn Glu Ser Asp Pro Leu Gln Leu Ser Phe Gly  
 50 55 60  
 Leu Thr Leu Met Gln Ile Ile Asp Val Asp Glu Lys Asn Gln Leu Leu  
 65 70 75 80  
 Ile Thr Asn Ile Trp Leu Lys Leu Glu Trp Asn Asp Met Asn Leu Arg  
 85 90 95  
 Trp Asn Thr Ser Asp Phe Gly Gly Val Lys Asp Leu Arg Val Pro Pro  
 100 105 110  
 His Arg Leu Trp Lys Pro Asp Val Leu Met Tyr Asn Ser Ala Asp Glu  
 115 120 125  
 Gly Phe Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asn Val Val Val Arg Asn Asn Gly  
 130 135 140  
 Ser Cys Leu Tyr Val Pro Pro Gly Ile Phe Lys Ser Thr Cys Lys Ile  
 145 150 155 160  
 Asp Ile Thr Trp Phe Pro Phe Asp Asp Gln Arg Cys Glu Met Lys Phe  
 165 170 175  
 Gly Ser Trp Thr Tyr Asp Gly Tyr Gln Leu Asp Leu Gln Leu Gln Asp  
 180 185 190  
 Glu Gly Gly Gly Asp Ile Ser Ser Phe Val Thr Asn Gly Glu Trp Glu  
 195 200 205  
 Leu Ile Gly Val Pro Gly Lys Arg Asn Glu Ile Tyr Tyr Asn Cys Cys  
 210 215 220  
 Pro Glu Pro Tyr Ile Asp Ile Thr Phe Ala Val Val Ile Arg Arg Lys  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Tyr Tyr Phe Phe Asn Leu Ile Val Pro Cys Val Leu Ile Ala  
 245 250 255  
 Ser Met Ala Leu Leu Gly Phe Thr Leu Pro Pro Asp Ser Gly Glu Lys  
 260 265 270  
 Leu Ser Leu Gly Val Thr Ile Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Leu Asn  
 275 280 285  
 Met Val Ala Glu Thr Met Pro Ala Thr Ser Asp Ala Val Pro Leu Leu  
 290 295 300  
 Gly Thr Tyr Phe Asn Cys Ile Met Phe Met Val Ala Ser Ser Val Val  
 305 310 315 320  
 Ser Thr Ile Leu Ile Leu Asn Tyr His His Arg His Ala Asp Thr His  
 325 330 335  
 Glu Met Ser Asp Trp Ile Arg Cys Val Phe Leu Tyr Trp Leu Pro Trp  
 340 345 350  
 Val Leu Arg Met Ser Arg Pro Gly Ser Ala Thr Thr Pro Pro Pro Ala  
 355 360 365  
 Arg Val Pro Pro Pro Asp Leu Glu Leu Arg Glu Arg Ser Ser Lys  
 370 375 380  
 Ser Leu Leu Ala Asn Val Leu Asp Ile Asp Asp Asp Phe Arg His Pro



385		390		395		400
Gln Ala Gln Gln	Pro 405	Gln Cys Cys Arg	Tyr 410	Tyr Arg Gly Gly	Glu 415	Glu
Asn Gly Ala Gly	Leu 420	Ala Ala His	Ser 425	Cys Phe Gly Val	Asp 430	Tyr Glu
Leu Ser Leu Ile	Leu 435	Lys Glu Ile	Arg 440	Val Ile Thr	Asp 445	Gln Met Arg
Lys Asp Asp Glu	Asp 450	Ala Asp 455	Ile Ser Arg	Asp 460	Trp Lys Phe	Ala Ala
Met Val Val Asp	Arg 465	Leu Cys Leu	Ile 470	Ile Phe Thr	Leu 475	Phe Thr Ile
Ile Ala Thr Leu	Ala 485	Val Leu Leu	Ser 490	Ala Pro His	Ile 495	Met Val Ser

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 3109 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: *Heliothis virescens*

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON(E): Hva7-2

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 95..1597

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GGCAGAGCC GGCCGCACGT TGTCCCAGGC CGCATGAGCG CGCCGGCGTG CTAGCGCAGC	60
GTGCGCGGGT GTGGTATGCC CGCGCGTCGC CGCT ATG GCC CCT ATG TTG GCG	112
Met Ala Pro Met Leu Ala	500
GCC TTG GCG CTG CTG GCT TTG CTG CCC GTA TCG GAG CAA GGT CCT CAC	160
Ala Leu Ala Leu Leu Ala Leu Leu Pro Val Ser Glu Gln Gly Pro His	505 510 515
GAG AAG AGA CTC CTG AAC GCG TTG CTG GCG AAC TAC AAC ACC CTG GAG	208
Glu Lys Arg Leu Leu Asn Ala Leu Leu Ala Asn Tyr Asn Thr Leu Glu	520 525 530
CGA CCG GTG GCC AAC GAG AGC GAA CCG CTA GAG GTC AGG TTC GGC TTG	256
Arg Pro Val Ala Asn Glu Ser Glu Pro Leu Glu Val Arg Phe Gly Leu	535 540 545 550
ACC TTG CAG CAA ATC ATT GAC GTG GAC GAG AAG AAT CAA CTA CTT ATA	304

Thr	Leu	Gln	Gln	Ile 555	Ile	Asp	Val	Asp	Glu 560	Lys	Asn	Gln	Leu	Leu 565	Ile		
ACC	AAT	ATA	TGG	CTG	TCG	TTG	GAG	TGG	AAT	GAC	TAC	AAC	CTG	AGG	TGG	352	
Thr	Asn	Ile	Trp 570	Leu	Ser	Leu	Glu	Trp 575	Asn	Asp	Tyr	Asn	Leu 580	Arg	Trp		
AAC	GAC	AGC	GAG	TAT	GGC	GGG	GTC	AAG	GAC	CTC	AGG	ATC	ACG	CCC	AAC	400	
Asn	Asp	Ser 585	Glu	Tyr	Gly	Gly	Val 590	Lys	Asp	Leu	Arg	Ile 595	Thr	Pro	Asn		
AAG	TTG	TGG	AAG	CCG	GAC	GTC	CTT	ATG	TAT	AAT	AGT	GCT	GAC	GAG	GGT	448	
Lys	Leu 600	Trp	Lys	Pro	Asp	Val 605	Leu	Met	Tyr	Asn	Ser 610	Ala	Asp	Glu	Gly		
TTT	GAC	GGG	ACC	TAC	CAG	ACC	AAC	GTG	GTG	GTC	AGA	AGC	GGC	GGC	AGT	496	
Phe	Asp	Gly	Thr	Tyr	Gln 620	Thr	Asn	Val	Val	Val 625	Arg	Ser	Gly	Gly	Ser 630		
TGC	CTG	TAC	GTG	CCA	CCT	GGC	ATA	TTC	AAG	AGC	ACA	TGC	AAG	ATG	GAC	544	
Cys	Leu	Tyr	Val	Pro 635	Pro	Gly	Ile	Phe	Lys 640	Ser	Thr	Cys	Lys	Met 645	Asp		
ATC	GCG	TGG	TTT	CCC	TTC	GAC	GAC	CAA	CAC	TGT	GAT	ATG	AAG	TTC	GGT	592	
Ile	Ala	Trp	Phe 650	Pro	Phe	Asp	Asp	Gln 655	His	Cys	Asp	Met	Lys 660	Phe	Gly		
AGC	TGG	ACA	TAT	GAC	GGC	AAT	CAG	TTG	GAT	CTG	GTG	CTA	AAA	GAT	GAG	640	
Ser	Trp	Thr 665	Tyr	Asp	Gly	Asn	Gln 670	Leu	Asp	Leu	Val	Leu 675	Lys	Asp	Glu		
GCA	GGC	GGC	GAT	CTA	TCG	GAC	TTC	ATA	ACA	AAT	GGG	GAG	TGG	TAT	CTA	688	
Ala	Gly 680	Gly	Asp	Leu	Ser	Asp 685	Phe	Ile	Thr	Asn	Gly 690	Glu	Trp	Tyr	Leu		
ATA	GGA	ATG	CCA	GGC	AAA	AAG	AAC	ACA	ATA	ACA	TAC	GCG	TGC	TGC	CCC	736	
Ile	Gly	Met	Pro	Gly	Lys 700	Lys	Asn	Thr	Ile	Thr 705	Tyr	Ala	Cys	Cys	Pro 710		
GAG	CCC	TAC	GTG	GAC	GTC	ACC	TTC	ACC	ATC	ATG	ATA	AGA	AGA	CGA	ACC	784	
Glu	Pro	Tyr	Val	Asp 715	Val	Thr	Phe	Thr	Ile 720	Met	Ile	Arg	Arg	Arg 725	Thr		
TTG	TAC	TAC	TTC	TTC	AAC	CTG	ATC	GTC	CCG	TGC	GTG	CTG	ATC	TCA	TCG	832	
Leu	Tyr	Tyr	Phe 730	Phe	Asn	Leu	Ile	Val 735	Pro	Cys	Val	Leu 740	Ile	Ser	Ser		
ATG	GCA	CTC	CTC	GGC	TTC	ACA	CTG	CCA	CCA	GAC	TCC	GGA	GAG	AAA	CTC	880	
Met	Ala	Leu 745	Leu	Gly	Phe	Thr	Leu 750	Pro	Pro	Asp	Ser	Gly 755	Glu	Lys	Leu		
ACA	CTT	GGA	GTC	ACT	ATT	CTT	CTA	TCG	CTG	ACG	GTG	TTC	CTC	AAC	CTG	928	
Thr	Leu 760	Gly	Val	Thr	Ile	Leu 765	Leu	Ser	Leu	Thr 770	Val	Phe	Leu	Asn	Leu		
GTA	GCC	GAG	ACC	CTG	CCA	CAG	GTC	TCC	GAC	GCT	ATC	CCC	CTG	TTA	GGG	976	
Val	Ala	Glu	Thr	Leu	Pro 780	Gln	Val	Ser	Asp 785	Ala	Ile	Pro	Leu	Leu	Gly 790		
ACG	TAC	TTC	AAT	TGC	ATC	ATG	TTC	ATG	GTA	GCG	TCG	TCT	GTG	GTA	CTG	1024	
Thr	Tyr	Phe	Asn	Cys 795	Ile	Met	Phe	Met	Val 800	Ala	Ser	Ser	Val	Val 805	Leu		
ACT	GTG	GTG	GTA	CTC	AAT	TAC	CAC	CAT	CGA	ACA	GCT	GAT	ATA	CAT	GAA	1072	
Thr	Val	Val	Val 810	Leu	Asn	Tyr	His	His 815	Arg	Thr	Ala	Asp	Ile 820	His	Glu		

ATG CCA CAG TGG ATA AAA TCA GTA TTC CTA CAA TGG TTG CCA TGG ATA	1120
Met Pro Gln Trp Ile Lys Ser Val Phe Leu Gln Trp Leu Pro Trp Ile	
825 830 835	
CTG CGA ATG TCG AGG CCA GGG AAG AAG ATC ACC AGG AAG ACT ATA ATG	1168
Leu Arg Met Ser Arg Pro Gly Lys Lys Ile Thr Arg Lys Thr Ile Met	
840 845 850	
ATG AAC ACG AGG ATG AGG GAG CTG GAA CTG AAG GAG AGG TCG TCG AAG	1216
Met Asn Thr Arg Met Arg Glu Leu Glu Leu Lys Glu Arg Ser Ser Lys	
855 860 865 870	
TCC TTG CTG GCG AAT GTT CTA GAT ATT GAT GAT GAC TTC AGA CAC GGC	1264
Ser Leu Leu Ala Asn Val Leu Asp Ile Asp Asp Asp Phe Arg His Gly	
875 880 885	
CCT CCG CCT CCT AAC AGT ACT GCC TCG ACC GGG AAT TTG GGA CCT GGC	1312
Pro Pro Pro Pro Asn Ser Thr Ala Ser Thr Gly Asn Leu Gly Pro Gly	
890 895 900	
TGC TCA ATA TTC CGC ACG GAT TTC CGT CGG TCG TTC GTC CGT CCG TCC	1360
Cys Ser Ile Phe Arg Thr Asp Phe Arg Arg Ser Phe Val Arg Pro Ser	
905 910 915	
ACG ATG GAA GAC GTG GGC GGC GGG CTG GGT AGC CAC CAT CGC GAG CTG	1408
Thr Met Glu Asp Val Gly Gly Gly Leu Gly Ser His His Arg Glu Leu	
920 925 930	
CAC CTC ATA CTG AGA GAG CTG CAG TTC ATC ACG GCC AGG ATG AAG AAG	1456
His Leu Ile Leu Arg Glu Leu Gln Phe Ile Thr Ala Arg Met Lys Lys	
935 940 945 950	
GCT GAT GAG GAA GCC GAG CTG ATC AGC GAC TGG AAG TTT GCT GCG ATG	1504
Ala Asp Glu Glu Ala Glu Leu Ile Ser Asp Trp Lys Phe Ala Ala Met	
955 960 965	
GTT GTT GAT AGG TTT TGC CTG TTC GTG TTC ACA CTT TTC ACA ATC ATC	1552
Val Val Asp Arg Phe Cys Leu Phe Val Phe Thr Leu Phe Thr Ile Ile	
970 975 980	
GCG ACA GTA GCT GTC CTG TTA TCG GCA CCG CAT ATC ATC GTG CAA	1597
Ala Thr Val Ala Val Leu Leu Ser Ala Pro His Ile Ile Val Gln	
985 990 995	
TGAACCAACC ACTGAGCCGG CAACTCCGGC GCATGAATGA GAGAAATAAT TATTAGATCG	1657
CCGATTTGTA ATTATAATTG ATAATGTAAT TAAATTAAAT ACGTGGTTGA AACGCACACG	1717
TCTCCATAAC AAAGTCTTAA GACATTAAAT TATGATAAAT TTACATATTG TAGTTAAGTC	1777
GAGTGTTGAT GGAAATTTTA GCCGGCGCAA GGAGTTTCGT GAAGGTCTGT ATATATTTTT	1837
TCTTATTGTT GTATATTGTA TCGTTGTTCA TGTTTTCTTT CAGGAAGTGA GCTTTGTA	1897
GTTTGTTTCT TCGATGGCAG GTGCACTTCA GTTCAGGCTG AAATTTCCAT TAACATTTAT	1957
TTAAACAAAT GTGATGTTGA CTAGGATGTT ATACAGATAA ATGTTGACGT GTATAATTTG	2017
TTAAATAAAA CAATATTAAT TACTATTACT AAACGATATT ATAAACGAAG TACTAACGAG	2077
GGTTACTTTA ATGGGAAGAA CGCTAAGCTG GCACAGAGTT GCATTAATTT GAAAAAAGAA	2137
ATTACGGAAA AAAGTTTATT GAAAATTGAA CTTTTTGGAA GGAAAGTAAC GTTTGATCAA	2197
AAAAGTTTGT AAAACGAAAG TTCGGTTCTG CGCCAATACT GGAATTAAAA TTCTCGTAAA	2257
TATTAGGGAA AAGAAGGTCC TTTAAAACAA AAGATTTGAA CCGGCATCCT TTTTACAAGT	2317

```

AATGAGGGAT CACAGATGAT GACAAAAAAC CTTAGGGTAT ATAAGTAATG TACATAATGG      2377
ATCAAATATC GGTAGAGTCA AGAATAGTTA ACGATTTAAG ATTATTCCAT TCGATATTAA      2437
AATTCGATTA GCGATTGTCTG CTGCGTCTAC TTTGATACAT ATCGATTGGA ATCGATATTG      2497
TATAAATTTA GATAGATCGG ACATTAGTAA TGAGTATGGA CGTTTTAATT TTTAAAAAAG      2557
AATGTACTAC GAAGATTAAA TCCAGGAATT GTTAAACAGT TATGGAATTG ATAAGAAATC      2617
AACAATTAAT ACGGAACCAA AGGTAGACTA GGTGTAGCAT CAGGAGATTG AATTAAAAACA      2677
TAAATTAGGA CCGACTTAAA TGGAACCTGC GAGTGTATTG ATAACTTTTT AATTTAAAAA      2737
CTCATTGTCTG ATTAAATGGA GAATAACTTT TGATCTCTCG TATCGATAAA TGCTCACTTA      2797
ACTATCGATA GCGTAATATT ATAACGTGTA GTATATCGAT ATGGGAGTAA GTCACTAGCA      2857
TCAGAAATAG TCATTAATTA GGAATCGGTT TGTGTTAATG TTATGCTTAG CGAAAATATT      2917
ACAATGCTGT TGATATCACT AACCATCACG TAACCATATT GATAAAATGT AAATACAGAA      2977
TATTGCGGTG TGTATTTGTA TATAAATTTT AGAAAAAAAA AAAAAAAAAA AACTCGAGAG      3037
TACTTCTAGA GCGGCCGCGG GCCCATCGAT TTTCCACCCG GGTGGGGTAC CAGGTAAGTG      3097
TACCCAATTC GC                                                                3109

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 501 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

```

Met Ala Pro Met Leu Ala Ala Leu Ala Leu Leu Ala Leu Leu Pro Val
 1           5           10          15
Ser Glu Gln Gly Pro His Glu Lys Arg Leu Leu Asn Ala Leu Leu Ala
          20          25          30
Asn Tyr Asn Thr Leu Glu Arg Pro Val Ala Asn Glu Ser Glu Pro Leu
          35          40          45
Glu Val Arg Phe Gly Leu Thr Leu Gln Gln Ile Ile Asp Val Asp Glu
 50          55          60
Lys Asn Gln Leu Leu Ile Thr Asn Ile Trp Leu Ser Leu Glu Trp Asn
 65          70          75          80
Asp Tyr Asn Leu Arg Trp Asn Asp Ser Glu Tyr Gly Gly Val Lys Asp
          85          90          95
Leu Arg Ile Thr Pro Asn Lys Leu Trp Lys Pro Asp Val Leu Met Tyr
          100         105         110
Asn Ser Ala Asp Glu Gly Phe Asp Gly Thr Tyr Gln Thr Asn Val Val
          115         120         125
Val Arg Ser Gly Gly Ser Cys Leu Tyr Val Pro Pro Gly Ile Phe Lys
          130         135         140
Ser Thr Cys Lys Met Asp Ile Ala Trp Phe Pro Phe Asp Asp Gln His

```

[illegible]

5

**Patentansprüche**

1. Nukleinsäure umfassend eine Sequenz ausgewählt aus

10

(a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5,

(b) zumindest 14 Basenpaare langen Teilsequenzen der unter (a) definierten Sequenzen,

15

(c) Sequenzen, welche an die unter (a) definierten Sequenzen hybridisieren in 2 x SSC bei 60°C, bevorzugt in 0,5 x SSC bei 60°C, besonders bevorzugt in 0,2 x SSC bei 60°C,

20

(d) Sequenzen, welche eine zumindest 70%ige Identität zu den unter (a) definierten Sequenzen zwischen Position 1295 und Position 2195 aus SEQ ID NO: 1 oder zwischen Position 432 und Position 1318 aus SEQ ID NO: 3 oder zwischen Position 154 und Position 1123 aus SEQ ID NO: 5 aufweisen,

25

(e) Sequenzen, welche zu den unter (a) definierten Sequenzen komplementär sind und

(f) Sequenzen, welche aufgrund der Degeneration des genetischen Codes für dieselbe Aminosäuresequenz kodieren wie die unter (a) bis (d) definierten Sequenzen.

30

2. Vektor umfassend zumindest eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1.

35

- 5
3. Vektor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuremolekül funktionell mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, die die Expression der Nukleinsäure in pro- oder eukaryotischen Zellen gewährleisten.
- 10
4. Wirtszelle enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder einen Vektor gemäß Anspruch 2 oder 3.
5. Wirtszelle nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine pro- oder eukaryotische Zelle handelt.
- 15
6. Wirtszelle nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die prokaryotische Zelle E.coli ist.
7. Wirtszelle nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die eukaryotische Zelle eine Säuger- oder Insektenzelle ist.
- 20
8. Polypeptid, welches von einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 kodiert wird.
9. Acetylcholinrezeptor umfassend zumindest ein Polypeptid gemäß Anspruch 8.
- 25
10. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß Anspruch 8 umfassend
- (a) das Kultivieren einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7 unter Bedingungen, die die Expression der Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 gewährleisten, und
- 30
- (b) die Gewinnung des Polypeptids aus der Zelle oder dem Kulturmedium.
- 35

- 5
11. Antikörper, welcher spezifisch mit dem Polypeptid gemäß Anspruch 8 oder dem Rezeptor gemäß Anspruch 9 reagiert.
12. Transgener Invertebrat enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1.
- 10
13. Transgener Invertebrat nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans* handelt.
14. Verfahren zur Herstellung eines transgenen Invertebraten gemäß Anspruch 12 oder 13 umfassend das Einbringen einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder eines Vektors gemäß Anspruch 2 oder 3.
- 15
15. Transgene Nachkommen eines Invertebraten gemäß Anspruch 12 oder 13.
- 20
16. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 umfassend die folgenden Schritte:
- (a) Vollständige chemische Synthese auf an sich bekannte Weise oder
- 25
- (b) chemische Synthese von Oligonukleotiden, Markieren der Oligonukleotide, Hybridisieren der Oligonukleotide an DNA einer Insekten-cDNA-Bank, Selektieren von positiven Klonen und Isolieren der hybridisierenden DNA aus positiven Klonen oder
- 30
- (c) chemische Synthese von Oligonukleotiden und Amplifizierung der Ziel-DNA mittels PCR.
17. Regulatorische Region, welche natürlicherweise die Transkription einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 in Insektenzellen kontrolliert und eine
- 35
- spezifische Expression gewährleistet.



5

18. Verfahren zur Auffinden neuer Wirkstoffe für den Pflanzenschutz, insbesondere von Verbindungen, welche die Leitungseigenschaften von Rezeptoren gemäß Anspruch 9 verändern, umfassend die folgenden Schritte:

10

(a) Bereitstellen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7,

(b) Kultivieren der Wirtszelle in der Gegenwart einer Verbindung oder einer Probe, welche eine Vielzahl von Verbindungen umfaßt, und

15

(c) Detektieren veränderter Leistungseigenschaften.

19. Verfahren zum Auffinden einer Verbindung, die an Rezeptoren gemäß Anspruch 9 binden, umfassend die folgenden Schritte:

20

(a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7, eines Polypeptids gemäß Anspruch 8 oder eines Rezeptors gemäß Anspruch 9 mit einer Verbindung oder einem Gemisch von Verbindungen unter Bedingungen, die die Interaktion der Verbindung(en) mit der Wirtszelle, dem Polypeptid oder dem Rezeptor erlauben, und

25

(b) Bestimmen der Verbindung(en), die spezifisch an die Rezeptoren binden.

30

20. Verfahren zum Auffinden von Verbindungen, die die Expression von Rezeptoren gemäß Anspruch 9 verändern, umfassend die folgenden Schritte:

(a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7 oder eines transgenen Invertebraten gemäß Anspruch 11 oder 12 mit einer Verbindung oder einem Gemisch von Verbindungen,

35

5

(b) Bestimmen der Rezeptorkonzentration, und

(c) Bestimmen der Verbindung(en), die die Expression des Rezeptors spezifisch beeinflussen.

10

21. Verwendung zumindest einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1, eines Vektors gemäß Anspruch 2 oder 3, einer regulatorischen Region gemäß Anspruch 16 oder eines Antikörpers gemäß Anspruch 11 zum Auffinden neuer Wirkstoffe für den Pflanzenschutz oder zum Auffinden von Genen, die für Polypeptide kodieren, welche am Aufbau von funktionell ähnlichen Acetylcholinrezeptoren in Insekten beteiligt sind.

15

Figur 1

